

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 20120051302135

UDC_____

廈門大學

硕 士 学 位 论 文

深海细菌 *Shewanella piezotolerans* WP3 中嗜冷
脂肪酶的表达鉴定及体外诱变研究

Expression, characterization and mutagenesis study of a
psychrophilic lipase from deep-sea bacterium *Shewanella*
piezotolerans WP3

黄 晶

指导教师姓名: 肖 湘 研究员

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2008 年 6 月

论文答辩时间: 2008 年 7 月

学位授予日期: 2008 年 月

答辩委员会主席: 陈 亮

评 阅 人: 王风平, 徐 俊

2008 年 7 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要	I
Abstract	III
缩写词表	V
1 前言	1
1.1 海洋极端微生物低温酶研究进展	1
1.1.1 海洋极端微生物和极端酶研究	1
1.1.2 海洋极端微生物低温酶研究	2
1.1.3 海洋极端微生物低温酶的生化特性	4
1.1.4 海洋极端微生物低温酶的分子适应机制	8
1.1.5 海洋极端微生物低温酶的应用和前景展望	10
1.2 微生物脂肪酶研究进展	12
1.2.1 微生物脂肪酶的酶学性质和分类	13
1.2.2 微生物脂肪酶的分子生物学	16
1.2.3 微生物脂肪酶的氨基酸组成和蛋白结构	16
1.2.4 微生物脂肪酶的分泌和折叠	19
1.2.5 微生物脂肪酶的催化机理	22
1.2.6 微生物脂肪酶的蛋白质工程	24
1.2.7 微生物脂肪酶的应用及前景展望	29
1.3 本论文的研究目的和意义	30
2 材料与方法	32
2.1 材料	32
2.2 方法	38
3 结果与讨论	46
3.1 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶基因的克隆和序列分析	46
3.1.1 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶与深海环境的适应关系	46
3.1.2 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶序列的分析	47

3.1.3 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶基因的克隆	52
3.1.4 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶的表达和纯化	52
3.2 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶的酶学性质	54
3.2.1 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶的最适反应温度和热稳定性	54
3.2.2 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶的最适 pH	54
3.2.3 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶的底物特异性	55
3.2.4 金属离子对希瓦氏菌 WP3 脂肪酶的影响	55
3.2.5 抑制剂和去污剂对希瓦氏菌 WP3 脂肪酶的影响	56
3.2.6 有机溶剂对希瓦氏菌 WP3 脂肪酶的影响	58
3.3 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶的结构分析和分子建模	58
3.3.1 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶的结构分析	58
3.3.2 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶的三级结构模型	60
3.3.3 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶低温适应的结构基础	62
3.4 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶低温活性和热稳定性研究	63
3.4.1 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶点突变的构建	63
3.4.2 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶突变蛋白的表达纯化	65
3.4.3 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶突变蛋白的最适反应温度	66
3.4.4 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶突变蛋白的热稳定性	67
3.4.5 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶突变蛋白的低温活性	67
3.4.6 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶突变蛋白结构和功能的关系	69
3.5 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶的定向进化	73
3.5.1 胞外分泌表达载体的筛选和构建	73
3.5.2 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶随机突变文库的构建	76
3.5.3 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶随机突变文库的筛选	80
3.5.4 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶突变蛋白低温活性和结构的关系	82
4 总结与展望	87
参考文献	89
致谢	95
附录	96

Contents

Chinese abstract	I
English abstract	III
Abbreviations	V
1 Introduction	1
1.1 Progress in psychrophilic enzymes of marine extremophiles	1
1.1.1 Marine extremophiles and extremozyme	1
1.1.2 Psychrophilic enzymes of marine extremophiles	2
1.1.3 Biochemical characteristics of psychrophilic enzymes	4
1.1.4 Adaption mechanism of psychrophilic enzymes	8
1.1.5 Application and perspective of psychrophilic enzymes	10
1.2 Progress in microorganism lipases	12
1.2.1 Enzyme properties and classification of microorganism lipases	13
1.2.2 Molecular biology of microorganism lipases	16
1.2.3 Amino acid composition and protein structure of microorganism lipases	16
1.2.4 Secretion and folding of microorganism lipases	19
1.2.5 Catalytic mechanism of microorganism lipases	22
1.2.6 Protein engineering of microorganism lipases	24
1.2.7 Application and perspective of microorganism lipases	29
1.3 Purpose and significance	30
2 Materials and methods	32
2.1 Materials	32
2.2 Methods	38
3 Results and discussion	46
3.1 Cloning and analysis of <i>Shewanella piezotolerans</i> WP3 lipase gene	46
3.1.1 Deep-sea adaption of <i>Shewanella piezotolerans</i> WP3 lipase	46
3.1.2 Sequence analysis of <i>Shewanella piezotolerans</i> WP3 lipase	47

3.1.3 Gene cloning of <i>Shewanella piezotolerans</i> WP3 lipase	52
3.1.4 Expression and purification of <i>Shewanella piezotolerans</i> WP3 lipase	52
3.2 Enzyme properties of <i>Shewanella piezotolerans</i> WP3 lipase	54
3.2.1 Effect of temperature on lipase activity and stability	54
3.2.2 Effect of pH on lipase activity	54
3.2.3 Substrate specificity for lipase	55
3.2.4 Effect of metal ions on lipase activity	55
3.2.5 Effect of inhibitors and detergents on lipase activity	56
3.2.6 Effect of organic solvents on lipase activity	58
3.3 Structure analysis and molecular modeling	58
3.3.1 Structure analysis of <i>Shewanella piezotolerans</i> WP3 lipase	58
3.3.2 Three-dimensional model of <i>Shewanella piezotolerans</i> WP3 lipase	60
3.3.3 Structural basis of cold-adaptation	62
3.4 Cold activity and thermostability of <i>Shewanella piezotolerans</i> WP3 lipase	63
3.4.1 Construction of single amino acid mutation	63
3.4.2 Expression and purification of lipase mutants	65
3.4.3 Optimum temperature of lipase mutants	66
3.4.4 Thermostability of lipase mutants	67
3.4.5 Cold activity of lipase mutants	67
3.4.6 Relationship between protein structure and function of lipase mutants	69
3.5 Directed evolution of <i>Shewanella piezotolerans</i> WP3 lipase	73
3.5.1 Screening and construction of secretion expression vector	73
3.5.2 Construction of random mutagenesis library	76
3.5.3 Screening out mutants	80
3.5.4 Relationship between cold activity and protein structure of mutants	82
4 Summary	87
References	89
Acknowledgement	95
Appendix	96

摘要

低温酶在理论研究和工业应用上的双重意义,使其成为近年来研究的热点。深海所拥有低温高压的极端环境,蕴藏有大量的低温微生物资源,它的开发对低温酶的研究具有重要意义。在生物催化剂的研究和应用中,微生物脂肪酶一直占据着非常重要的地位。而微生物低温脂肪酶由于具有反应温度低和对热敏感等特点,在食品、化妆品、皮革、饲料、废物处理等工业上有着其它脂肪酶无法比拟的优越性。

2003 年我们在西太平洋暖池区 1914 米的沉积物中分离到一株具有脂肪分解能力的耐压低温细菌 *Shewanella piezotolerans* WP3, 其生长温度范围是 0-28°C, 最适生长温度是 20°C。希瓦氏菌 WP3 脂肪酶基因的开放阅读框由 759 个核苷酸组成, 编码由 252 个氨基酸组成, 分子量约为 30kDa 的蛋白质。希瓦氏菌 WP3 脂肪酶属于第 V 家族的细菌脂肪酶, 与 *Haemophilus influenzae* Rd KW20 酯酶的氨基酸序列有最大的同源性, 它的催化三联体分别是 Ser82、Asp202 和 His231, 同时存在第 V 家族细菌脂肪酶未知功能保守序列同源的结构。

酶学性质分析表明, 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶是一个低温酶, 最适反应温度是 20°C, 在 4°C 它还能保持 80% 的最大活性。它对热敏感, 最适 pH 为 7.0-8.0, 能够分解中短链 PNP 底物。他的活性易受金属离子、抑制剂和去污剂及有机溶剂的影响, 但是 EDTA 能够稍微增加其活性, 说明希瓦氏菌 WP3 脂肪酶是一个非金属离子依赖的脂肪酶。氢键取代二硫键, 成为维持脂肪酶三级结构稳定性最重要的相互作用。

我们在希瓦氏菌 WP3 脂肪酶中发现了一些适应低温的结构特征。代表蛋白柔性的 Gly 在脂肪酶活性位点附近出现, 而代表蛋白刚性的 Pro 数量明显减少。希瓦氏菌 WP3 脂肪酶和其它低温脂肪酶的 Arg 与 Lys+Arg 的比值减少, 而疏水区及疏水内核的氨基酸残基数也较少。同时, 它的蛋白表面含有大量带电荷的残基, 特别是 Asp 的比例增加, 缺少在中温和高温脂肪酶中保守的二硫键。

为了进一步研究希瓦氏菌 WP3 脂肪酶结构与其低温活性和热稳定性的关系, 我们构建了一系列氨基酸的点突变。结果表明, Leu14 和 Lys246 是希瓦氏菌 WP3 脂肪酶低温活性的关键氨基酸, 而 Asp23 和 Gly97 是其热稳定性的关键

氨基酸。脂肪酶催化活性中心的蛋白质构象改变，一方面能够影响催化能力和底物结合能力而改变脂肪酶的低温活性，同时也能改变脂肪酶的热稳定性；另一方面也可能带来无活性产物的大量积累。此外，我们还初步研究了第 V 家族细菌脂肪酶的未知功能保守序列。我们推测，第 V 家族细菌脂肪酶未知功能保守序列与底物结合无关，其位于蛋白内部疏水区的部分与脂肪酶低温活性密切相关，而位于蛋白表面负电荷区的部分与脂肪酶的热稳定性密切相关。

最后，我们构建了一个包含约 10000 个突变子的希瓦氏菌 WP3 脂肪酶随机突变文库。通过筛选验证，我们获得了 4 个脂肪酶低温活性发生显著变化的突变子，其中 2 个突变子的脂肪酶低温催化效率(k_{cat}/K_m)分别提高到野生型的 1.8 倍和 1.6 倍。这就为今后我们进一步改造希瓦氏菌 WP3 脂肪酶，并使之具有工业应用价值打下了一定的基础。

希瓦氏菌 WP3 脂肪酶是第一个从希瓦氏菌中克隆表达并进行了酶学性质鉴定的脂肪酶，为进一步研究嗜冷脂肪酶的低温适应机制和稳定性提供了很好的材料。我们利用定点突变技术研究了对这个嗜冷脂肪酶低温活性和热稳定性起关键作用的氨基酸，并通过定向进化筛选到一些低温活性发生改变的突变脂肪酶，为利用蛋白质工程技术改造天然酶提供了理论依据。

关键词：*Shewanella piezotolerans* WP3；低温酶；脂肪酶；定点突变；定向进化

Abstract

Lipases are versatile tools for biotechnological applications not only their potential to catalyze the hydrolysis but also the synthesis of many useful ester compounds. Numerous lipases have already been isolated and characterized from animals, plants, and microorganisms. Most of the lipases used in industry are microbial enzymes, which have been extensively characterized biochemically. Psychrophilic lipases derived from extremophiles of deep-sea have lately attracted attention as a result of their increasing use due to their high activity at low temperatures and thermolability, which are favorable properties for the production of fatty acids and interesterification of fats in the food, pharmaceutical, and fine-chemical industries.

A piezotolerant and psychrotolerant bacteria *Shewanella piezotolerans* WP3, showing lipolytic activity, was previously isolated from deep-sea sediments of 1914m depth in west Pacific Warm Pool. It could grow at a temperature range of 0-28°C and the best growth temperature was around 20°C. The open reading frame of *Shewanella piezotolerans* WP3 lipases consisted of 759 nucleotides, encoding a protein of 252 amino acids with a predicted molecular mass of approximate 30kDa. This lipase is a member of family V lipases, and had the highest homology with the esterases of *Haemophilus influenzae* Rd KW20. The catalytic triad of *Shewanella piezotolerans* WP3 lipases is composed of Ser82, Asp202 and His231. Additionally, the unknown conserved sequence of family V lipases could be found in N-terminal part of this lipase.

Shewanella piezotolerans WP3 lipase is a psychrophilic enzyme with a low optimum temperature of 20°C, and retains 80% activity even at 4°C. It is a thermolabile and pH neutral lipase, which is able to hydrolyze short to medium chain PNP esters. Metal ions, various reagents and organic solvents could inhibit the hydrolytic activity of *Shewanella piezotolerans* WP3 lipase except for EDTA, which indicate the independence of metal ions. H-bonds, rather than disulfide bridges, are

the most important interactions in the stability of protein structure.

Structural modifications involved in cold-adaptation had been detected from structure analysis. A large amount of charged residues exposed at the protein surface, and a relative smaller hydrophobic core region. The lack of disulfide bridges, which are conserved in mesophilic and thermophilic lipases. A low proportion of arginine residues as compared to lysines, a low content in proline residues and a high content in glycine residues were also observed. All these properties should confer on the lipase a more flexible structure, in accordance with its low thermostability.

For further study of the relationship between structure and activity or stability, a series of single amino acid mutants had been constructed by site-directed mutagenesis. For *Shewanella piezotolerans* WP3 lipase, Leu14 and Lys246 may be the key residues of cold activity, while Asp23 and Gly97 may be the key residues of thermostability. Conformation changes of lipase active center, may affect cold activity by changes of catalytic ability and substrates affinity, but also the thermostability, and even lead to accumulation of non-active products. It is also predicted that hydrophobic region of unknown conserved sequence and cold activity are closely relative, and protein surface region of that and thermostability are closely relative, while it play no role in substrates affinity.

A high quality random mutagenesis of *Shewanella piezotolerans* WP3 lipase, containing around 10000 mutants, was constructed by error-prone PCR method. After screening, 2 of them were found to be favorable mutants with 1.8-fold and 1.6-fold catalytic efficiency(k_{cat}/K_m) of wild type lipase at low temperature.

Shewanella piezotolerans WP3 lipase is the first lipase expressed and characterized from *Shewanella* strains. This study on the cold-adaption of lipase may facilitate the research of relationship between enzyme structure and activity(stability), and the protein engineering of biocatalysts.

Key words: *Shewanella piezotolerans* WP3; psychrophilic enzyme; site-directed mutagenesis; directed evolution

缩写词表

2-ME	β -mercaptoethanol β -巯基乙醇
APS	ammonium persulfate 过硫酸铵
BSA	bovine albumin serum 牛血清白蛋白
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propane sulfonate 3-[3-(胆酰胺基丙基)二甲氨基]丙磺酸盐
DDW	double distilled water 双蒸水
DEPC	diethyropyrocarbonate 焦碳酸二乙脂
DMSO	dimethyl sulfoxide 二甲亚砜
DMF	N, N-dimethylformamide N, N-二甲基甲酰胺
DNA	deoxyribonucleic acid 脱氧核糖核酸
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate 脱氧核苷三磷酸
DTT	dithiothreitol 二硫苏糖醇
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i> 大肠杆菌
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid 乙二胺四乙酸
IPTG	isopropylthio-D-galactoside 异丙基--D-半乳糖苷
LB	Luria Borth medium 肉汤培养基
OD	optical density 光密度
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis 聚丙烯酰胺凝胶电泳
PCR	polymerase chain reaction 聚合酶链式反应
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride 苯甲基磺酰氟
PNP	p-Nitrophenyl 对硝基苯基
RNA	ribonucleic acid 核糖核酸
SDS	sodium dodecyl sulfate 十二烷基磺酸钠
SPL	<i>Shewanella piezotolerans</i> WP3 lipase 希瓦氏菌 WP3 脂肪酶
TAE	Tris/acetate electrophoresis buffer Tris/醋酸电泳缓冲液
TE Tris/EDTA	Tris/EDTA 缓冲盐溶液
TEMED	N N N' N'-tetramethylethylenediamine N N N' N'-四甲基二乙胺

Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane	三羟基甲基氨基甲烷
X-Gal	5-bromo-4-choro-3-indolyl- β -D galactopyranosi	5-溴-4-氯-3-吲 哚- β -D-半乳糖吡喃

厦门大学博硕士论文摘要库

1 前言

1.1 海洋极端微生物低温酶研究进展

1.1.1 海洋极端微生物和极端酶研究

海洋微生物是重要的可再生海洋自然资源，具有丰富的基因库和生物多样性。神秘古老的海洋千变万化，经过长期环境适应，造就了形形色色的极端微生物(extremophiles)。海洋极端微生物产酶资源具有突出的特点和优势：显著的耐压、耐碱、耐盐和耐冷特性；代谢易于调控；在低温条件下具有相对较高的活性。目前，作为新型酶源的海洋微生物已被大量发现，包括真菌、细菌、古细菌和噬菌体等，表现了丰富的生物多样性。据报道，弧菌(vibrio)是产酶最广泛的海洋菌种，弧菌来源的极端酶有琼脂糖酶(agarase)、谷氨酰胺酶(glutaminase)、几丁质酶(chitinase)、蛋白酶(protease)、甘露聚糖酶(mannanase)等^[1]。海洋极端微生物体内独特而强大的极端酶系在为其生存提供保证的同时，也为人类提供了巨大的宝贵财富。极端酶超出了普通酶催化功能临界范围的优异催化效果，给众多领域带来了新的活力，大大拓宽了目前的应用范围。这些结构和功能新颖的酶类具有独特的生理、药理及生化活性，在食品、医药卫生、工业和国防等领域中有着广阔的应用前景和开发潜力。

20 世纪 80 年代以前，海洋微生物极端酶的研究几乎是空白。随着科学技术的发展和人们对海洋资源开发意识的增强，以及极端酶促进国民经济发展的重大理论和现实意义，海洋微生物极端酶的研究与开发也提上了议事日程。20 世纪末，许多发达国家特别是美国，西欧和日本，凭借其技术和资金的优势投入巨大的人力物力，纷纷制定开展大规模开发利用海洋生物资源的研究计划，海洋微生物极端酶的研究是其中的重要方面。目前，在美国、日本、德国等地有许多研究课题组正活跃于寻找海洋微生物极端酶。按照常规的极端酶筛选方法，从极端环境中采集样品、富集、分离极端菌，再通过特定选择标记筛选极端酶，已经获得了嗜冷的 α -淀粉酶、枯草杆菌蛋白酶，嗜热的淀粉酶、蛋白酶、葡萄糖苷酶、木聚糖酶、DNA 聚合酶，耐盐的蛋白酶、谷氨酰胺酶，嗜碱的蛋白酶、淀粉酶、木聚糖酶、海藻酸裂解酶、脂肪酶。海洋极端微生物的工业应用酶已经成为美国海洋生物技术的重要领域(Sea Grant's Network Plan 1995-2005)，1997 至 1999 年

由海洋基金资助的在研项目中，海洋微生物酶项目就有 4 个。根据 1996 年底的美国海洋基金报告，美国对海洋生物技术的支持在不断增加，国家海洋基金的投资 1994 年为 320 万美元，而 1996 年已经增加到 1200 万美元。1994 年美国 RBI 公司(Recombinant Bio-catalysis Inc)直接从极端环境中收集 DNA 样品，随机切割成限制性片段，再插入寄主细胞进行表达筛选极端酶，获得了 175 种新的极端酶。日本在海洋生物酶的研究方面也在不断加大投入，于 1992 年提出了在深海微生物中寻找具有特殊性质的蛋白质基因并使其产业化的计划(如“深海之星”计划)，有关酶的在研项目涉及到了低温酶、高温酶、碱性酶。在加拿大，海洋科学研究所 1997 到 1999 年也开展了海洋嗜热菌热稳定性酶的研究。另外，西班牙、芬兰和俄罗斯等国家也加紧对海洋微生物极端酶的研究^[2]。对海洋微生物极端酶的研究取得了很多成果，有的也已经实现产业化。从总体上看，有关海洋微生物极端酶的研究在全球范围内仍是刚刚起步，人们对海洋环境的认识仍然有限，大部分的海洋极端菌还是不可培养的，从而限制了海洋微生物极端酶的开发。但是海洋微生物极端酶研究开发的巨大潜力和应用价值，还是愈来愈引起世界各个国家的重视。

1.1.2 海洋极端微生物低温酶研究

在地球表面，低温是具有最广泛影响的生态因子。生物圈中超过 80% 的区域是低温环境，而其中 90% 属于常年平均温度低于 5°C 的海洋环境，其余的包括永久冻结带、冰川、极地冰山以及雪山等环境。这些环境中，存在着大量的低温微生物，它们细胞的生理生化过程适应环境而发生了重大变化。作为低温微生物生命过程中占据重要地位的生物催化剂，低温酶引起了人们诸多的研究兴趣。

低温酶，也称嗜冷酶(psychrophilic enzyme)、冷活性酶(cold active enzyme)或适冷酶(cold-adapted enzyme)。根据 Margsin 等的定义，通常把最适催化温度在 30°C 左右，在 0°C 左右仍有一定催化效率的酶称为低温酶^[3]。Feller 于 1996 年提出，低温酶应具有如下特征：(1)酶活曲线作为温度的函数趋向于低温；(2)在低温范围内(<40°C)酶的催化常数(k_{cat})或催化效率(k_{cat}/K_m)高于来自中温菌中的同类酶；(3)在室温条件下酶的热稳定性较差^[4]。目前研究得较多的低温酶，大多来源于极地、低温高压深海或深海沉淀物中的极端微生物。具有能催化低温条件下生物体内所有生化反应的酶是嗜冷微生物在低温环境中生存的一个极为重要

的特点。最早从嗜冷菌中研究低温酶的是 Morita 等人，他们发现海产弧菌(*Vibrio*

表 1-1 海洋极端微生物及所产的低温酶

Table1-1 Psychrophilic enzyme and marine enzyme-producing strain

极端微生物低温酶	来源菌株
葡萄糖酶	珀酸丝状杆菌(<i>Fibrobacter succinogenes</i>)
磷酸酶	嗜冷细菌
	希瓦氏菌(<i>Shewanella</i> sp.)
α -淀粉酶	河豚毒素交替单胞菌(<i>Alteromonas haloplantis</i>)
碱性蛋白酶	铜绿假单胞菌(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
β -半乳糖苷酶	节杆菌(<i>Arthrobacter</i> sp.)
β -内酰胺酶	静止嗜冷杆菌(<i>Psychrobacter immobilis</i>)
苹果酸脱氢酶	嗜冷嗜压光合细菌(<i>Photobacterium</i> sp.)
	深海嗜冷弧菌(<i>Vibrio</i> sp. strain no. 5710)
磷酸丙糖异构酶	嗜冷弧菌(<i>Vibrio</i> sp.)
丙酮酸激酶	嗜冷芽孢杆菌(<i>Bacillus psychrophilus</i>)
枯草杆菌蛋白酶	枯草杆菌(<i>Bacillus</i> sp. TA41)
碱性丝氨酸蛋白酶	枯草杆菌(<i>Bacillus</i> sp.)
	希瓦氏菌(<i>Shewanella</i> sp.)
蛋白酶	大比目鱼金黄杆菌(<i>Flavobacterium balustinum</i>)
柠檬酸合成酶	南极细菌
丙氨酸消旋酶	冷解糖芽孢杆菌(<i>Bacillus psychrosaccharolyticus</i>)
乙醇脱氢酶	莫拉氏菌属(<i>Moraxella</i> sp.)
β -甘露聚糖酶	黄杆菌(<i>Flavobacterium</i> sp.)
天冬氨酸氨甲酰基转移酶	嗜冷弧菌(<i>Vibrio</i> sp.)
	南极嗜冷细菌
碱性磷酸酶	节杆菌(<i>Arthrobacter</i> sp.)
谷氨酸脱氢酶	气单胞菌(<i>Aeromonas</i> sp.)
脂肪酶	假单胞菌(<i>Pseudomonas</i> sp.)

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库